

# エバネセント場蛍光顕微鏡による生体分子の 1 分子機能解析

船津 高志・上野 太郎

## Functional Analysis of Single Biomolecules Using Evanescent Field Fluorescence Microscopy

Takashi FUNATSU and Taro UENO

Progress of the optical microscopy such as evanescent field illumination, and optical tweezers enabled us to study function of biomolecules at single molecular level. Single molecule imaging has become an indispensable technique to life science research. Here, we introduce and survey techniques of single molecule imaging and manipulation of single molecules.

**Key words:** fluorescence, evanescent field, zero-mode wave guide, chaperonin, single molecule imaging

ゲノムの塩基配列が決められ、次の目標として残ったのは、実際に発現している遺伝子は何か、その遺伝子産物（おもにタンパク質）は、いつどの細胞でどのように発現しているのか、そして機能は何かという問題である。1 分子蛍光イメージング法は、これらの問題を解明するための基盤技術を提供すると期待されている。ここでは、まず、1 分子計測することの意義を考察する。

従来の生物科学研究では、生体分子の性質を、試験管内の多数分子の平均値として表してきた。例えば、濃度  $1 \mu\text{M}$  ( $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/liter}$ )、体積  $1 \text{ ml}$  の溶液中には、約  $10^{15}$  個の分子が含まれている。この場合、個々の分子の平均値からのずれを表す標準偏差と平均値との比は  $10^{-7}$  以下になり、測定装置に由来する誤差に比べて無視できるほど小さい。このように、多分子計測では平均値を非常に正確に求めることができるが、分子のダイナミクスを研究することは困難である。生物分子モーターの化学・力学エネルギー変換のように、1 分子が担っている 2 種類の反応のタイミングを明らかにするには、1 分子ごとに計測しない限り不可能である<sup>1)</sup>。多分子計測のもう 1 つの欠点は、平均値から 1 分子の機能を推論するためには、ある仮定を必要とするの

で、明確な結論を得ることが難しいことである。最も頻繁に使われる仮定は「すべての分子は同様に振る舞う」という仮定である。しかし、1 分子計測によって、生物分子モーターの力発生や、コレステロール酸化酵素などの酵素作用に履歴作用があることがわかり、この仮定が必ずしも成立しないことが明らかになっている<sup>1,2)</sup>。1 分子計測は技術的に難しいが、仮定のない明快な結論を導き出すことができるという長所がある。ただし、1 分子計測を 1 回行うだけでは不十分で、複数回の測定を行い統計的な解析を必要とする場合が多い。生体分子の多くは ATP (adenosine 5'-triphosphate) の加水分解のエネルギーを利用してさまざまな仕事をしているが、ATP の加水分解によって利用できる自由エネルギーはわずか  $10^{-19} \text{ J}$  (1 自由度あたりの熱エネルギーの 40 倍) しかない。このため、生体分子は、絶えず熱ゆらぎの影響を受けており、確率論的に作用するという性質をもっている。したがって、1 回測定しただけでは 1 分子の特性を十分に決定したことになるが、繰り返し測定して統計処理をすることにより、はじめて生体分子の機能が明らかになる。

## 1. 1 分子蛍光イメージングの原理

### 1.1 蛍光顕微鏡による 1 分子観察の歴史

タンパク質の大きさは光の波長よりもずっと小さいので、これを検出するには特別の工夫が必要である。生体分子に蛍光色素を結合させ、蛍光によって分子の存在がわかるようにしたのが蛍光顕微鏡法である。蛍光とは、色素分子が光のエネルギーを吸収して再び光を放射する現象であり、一般に吸収した光の波長よりも放射する蛍光波長のほうが長くなる。そのため、色素をレーザー光で励起して、その励起光を光学フィルターで除いて蛍光の放射光のみを検出するようにすれば、高感度な検出が可能になる。励起光が少しでも検出器に入ってくると蛍光は見にくくなる。1980 年代になって、DNA<sup>3)</sup> やアクチン<sup>4)</sup> (筋タンパク質の一種) などの繊維状の巨大分子を、1 分子レベルで蛍光顕微鏡観察できるようになったが、これらの観察は、生体分子に数百個の蛍光色素を結合させて、ようやく見えるものだった。1 分子の蛍光色素は超高感度カメラならば検出可能な数の光を放出しているが、強い励起光をあてるとさまざまな光学部品より蛍光が発生し背景光となるため、1 分子からの蛍光が埋もれて見えなくなる。この背景光をいかにして少なくするかが 1 分子観測の最大の問題点であった。1990 年代になって、顕微鏡の部品から発生する背景光の問題を解決することにより、1 分子の蛍光観察が可能になった<sup>5,6)</sup>。さらに、「エバネセント場」を利用した局所励起を行うことにより、1 分子の生体分子が酵素反応している様子や運動している様子をイメージングすることが可能となった<sup>5,7)</sup>。

### 1.2 エバネセント場による局所励起

伝播光を使って蛍光色素を局所励起するために、レーザー光を回折限界まで集光させる方法がとられる。しかし、この方法では、励起する領域は波長の半分程度の広がりをもってしまふ。さらに照射領域を小さくする方法として、エバネセント場(消滅場)を利用する方法がある。エバネセント場が発生する代表的な例として、金属コートした光ファイバーの先端に入射光の波長よりも小さい微小開口を設ける方式がある。開口径 50~200 nm のものがプローブとして使われ、これを走査して画像を得る顕微鏡は NSOM (near field scanning optical microscopy) とよばれる<sup>8)</sup>。これは、光の回折限界を超えた分解能で観察が可能であること、走査型トンネル顕微鏡や原子間力顕微鏡などの他の走査型顕微鏡と組み合わせることが可能であるという長所をもつ。しかし、プローブの制御が難しく、時間分解能が悪いという欠点があるため、生物学へ応用することは難しかった。

エバネセント場を発生させる最も簡単な方法は、全反射を利用する方法である。高屈折率の媒質(ガラス)から低屈折率の媒質(水溶液)に臨界面以上で光を入射させると、全反射が起こり、低屈折率の媒質の界面近傍にエバネセント場が生成される。エバネセント場は、界面から深さ方向に指数関数的に減衰する局所場である。このため、波長よりも短い領域を照明することができる。エバネセント場も伝播光と同様に、物体による散乱を受けたり蛍光色素を励起することが可能である。散乱光や蛍光のみを伝播光として検出できるので、背景光がきわめて小さく、1 分子の蛍光色素の観察に適している。エバネセント場は界面のごく近傍しか照明しないので、背景光を抑えられるだけでなく、蛍光標識した生体分子を局所励起できるという利点がある。

## 2. エバネセント場蛍光顕微鏡を用いた 1 分子イメージング研究の具体例

すでに、1 分子蛍光イメージング法を用いて、1 分子の酵素反応<sup>2,5)</sup>、モータータンパク質の運動<sup>7,9,10)</sup>、タンパク質間相互作用<sup>11,12)</sup> がイメージングされている。さらに、細胞表面での受容体とリガンドの結合<sup>13)</sup> などが研究されている。以下では、エバネセント場を使った 1 分子イメージングの研究例を紹介する。

### 2.1 酵素反応を見る

1 分子の蛍光分子が見えるので、蛍光色素で標識した任意の生体分子をイメージングできる。そこで、生物の重要なエネルギー源である ATP に Cy3 (蛍光色素) を結合させた Cy3-ATP を用いて、筋肉の生物分子モーターであるミオシン 1 分子が 1 分子の ATP を加水分解している様子を直接イメージングした<sup>9)</sup>。ここで、1 分子の ATPase 反応のイメージング法の原理について解説する(図 1)。まず、ガラス表面上に Cy5 で蛍光標識したミオシン分子を固定し、ミオシン分子の位置を確認する。次に、Cy3-ATP を加える。エバネセント照明では、ガラス基板から約 150 nm の距離にいる蛍光色素しか励起されない。ミオシンに結合していない Cy3-ATP はブラウン運動をしているため、たとえ照射領域に入ったとしても、蛍光スポットとして観察されず背景光となるだけである。Cy3-ATP がミオシンに結合するとブラウン運動が制限され、はじめて輝点として観察できるようになる。Cy3-ATP がミオシン分子上で加水分解され、Cy3-ADP が解離すると再び暗くなる。この光の点滅によって ATP のターンオーバーをイメージングする。

1 分子イメージングと光ピンセットによるナノ分子操作

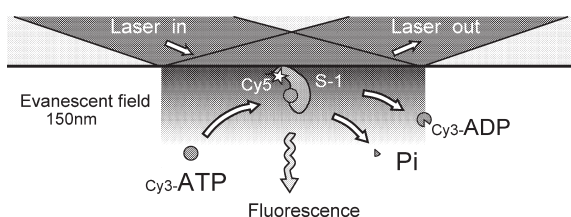


図1 ATP加水分解反応の1分子イメージングの模式図。

を組み合わせることにより、生物分子モーターの化学反応と力学反応を1分子レベルで同時計測した<sup>1)</sup>。このために、まずアクチンフィラメントの両端を直径1  $\mu\text{m}$  のマイクロビーズに結合させ、光ピンセットで捕捉した。続いてアクチンフィラメントとミオシンを相互作用させ、ミオシンが発生する数 pN の張力をビーズの数 nm の変位から検出した。一方、ミオシンの ATPase は Cy3-ATP の蛍光強度変化から求めた。その結果、ヌクレオチドの放出から数十〜数百ミリ秒遅れて力を発生する事例が確認された。この現象は、生物分子モーターの力発生が ATP の加水分解あるいは、無機リン酸や ADP (adenosine 5'-diphosphate) の解離と共役しているとするいままでの説では説明できない。この結果は、タンパク質が ATP の加水分解で受け取った自由エネルギーを内部に貯めておき、必要なタイミングを計って仕事をするという高度な機能をもっていることを示している。

以上の研究は、基質に蛍光色素を結合させて酵素反応をイメージングしたが、酵素が蛍光を有する場合は、この蛍光を利用して1分子イメージングすることが可能である。コレステロール酸化酵素は、補酵素として FAD (flavin adenine dinucleotide) を結合している。コレステロールの酸化に伴って FAD が還元されて FADH<sub>2</sub> となり、自然酸化により FAD に戻る。FAD は蛍光を発するが、FADH<sub>2</sub> は蛍光を出さないため、この性質を利用して酵素反応が1分子イメージングされている<sup>2)</sup>。解析の結果、酵素反応が終了した直後の1秒くらいの間は、次の反応が速やかに進行することが示された。ミオシンやコレステロール酸化酵素にみられる履歴効果は、1分子計測によってはじめて明らかにされた現象である。

## 2.2 生体分子の運動を見る

次に、生物分子モーターであるキネシンを蛍光標識し、1分子のキネシンが微小管上を滑り運動する様子を観察した例を紹介する<sup>7,10)</sup>。図2は、微小管をガラスに固定し、蛍光標識したキネシンを ATP とともに加え、全反射蛍光顕微鏡で観察した結果である。1分子のキネシンが 500 nm/s の速さで微小管上を滑り運動している様子が観察された。

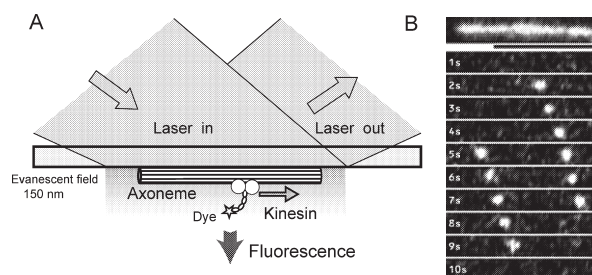


図2 キネシンの微小管上の滑り運動。(A) 実験の模式図。(B) 最上図は微小管の蛍光顕微鏡写真。2段目以降は蛍光標識したキネシンが移動する様子。左側の数字は経過時間を示している。スケールは 10  $\mu\text{m}$ 。

滑り運動距離の度数分布は、平均 1000 nm の指数分布となった。キネシンは 8 nm のステップで微小管上を移動するので、平均 120 ステップで微小管から外れることになる。キネシンが微小管から一度でも離れるとブラウン運動で拡散してしまうため、外れるまでの平均ステップ数から、キネシンが結合・解離の運動サイクルのうち 99% 以上、微小管に結合したままであることを直接示せたことになる。

## 2.3 タンパク質分子間相互作用を見る

1分子イメージングによるタンパク質相互作用の研究例を、シャペロニンによるタンパク質折りたたみ機構を例として解説する。タンパク質が機能を発揮するためには、ポリペプチドが正しく折りたたまれ、ある立体構造を形成する必要がある。この折りたたみを助けているのが分子シャペロンである。さまざまな分子シャペロンの中で、最も研究が進んでいるのが大腸菌の GroEL である。GroEL は、7つのサブユニット (分子量 57 k) からなる「かご」状のリングが2層に重なった構造をしている。GroEL に ATP が結合すると、補助因子である「ふた」状の GroES と結合して巨大な空洞をもった複合体を形成する。この空洞の中で、シャペロニンの基質となるタンパク質の折りたたみが起こる (図3A)。蛍光色素 IC5 で標識した GroEL をガラスに固定し、変性タンパク質と ATP 存在下で蛍光標識した GroES が GroEL に結合・解離するダイナミクスを観察した (図3B)。GroEL の活性を保持したまま蛍光色素を結合させるために、変異 GroEL (D490C) を作製し、このシステイン残基に IC5 のマレイミド基を反応させた。また、GroEL がガラス基盤に直接吸着すると変性してしまうので、ガラスをビオチン化した BSA (bovine serum albumin) でコートしておき、ストレプトアビジンを介してビオチン化した GroEL を基板に固定した。次に、別の蛍光色素 Cy3 で標識した GroES を溶液に加え GroEL と結合・解離する様子を観察した。GroES のブラウン運動は非常に早いので、ビデオでは蛍光の輝点として観察さ



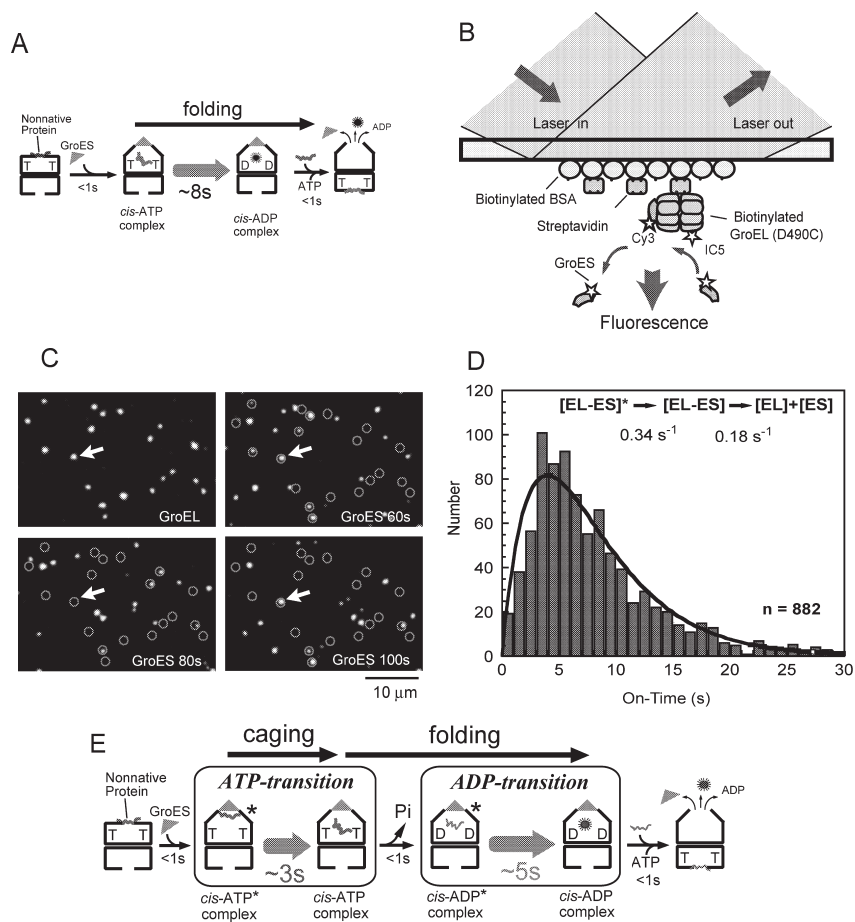


図3 GroELとGroESの結合・解離の1分子イメージング。(A)従来のシャペロニン反応サイクルのモデル。(B)実験の模式図。(C)1分子のGroELとGroESの蛍光顕微鏡写真。(D)GroESの結合時間のヒストグラム。(E)修正されたシャペロニン反応サイクル。

れず背景光となるだけである。したがって、ブラウン運動する分子は見えず、結合して止まった分子だけを観察できるのである。このように、分子のブラウン運動と全反射による局所励起を巧みに組み合わせることにより、GroELとGroESの1分子間相互作用をイメージングすることが可能になった(図3C)。GroESの結合時間を解析した結果、GroESは、ある中間体を経てから解離する二段階反応であり、それぞれの反応の時定数は3秒と5秒と見積もられた(図3D)。次に、この中間体がどのような役割を果たしているのかを明らかにするため、シャペロニン分子内で起こる変性タンパク質の折りたたみを1分子イメージングした。このために、変性したGFPは蛍光を発しないが折りたたむと再び蛍光を発する性質を利用した。まず、酸変性させたGFPをGroELの入った溶液に希釈し、変性GFP-GroEL複合体を作製し、スライドガラス上に固定した。その後GroESとCaged ATP(ATPに保護基を結合させて不活化した化合物。紫外光照射により保護基が分解しミリ秒でATPが生成される)を加え、顕微鏡下で紫外

線を照射してATPを生成し、シャペロニンの反応を開始させた。その結果、紫外線照射後、3秒たってからGFPの蛍光が現れた。このようにして、1分子のタンパク質がフォールディングするところをはじめてイメージングすることに成功し、シャペロニンによるタンパク質折りたたみに特徴的な3秒のタイムラグが明らかになった。新たに見つかったGroEL中間体は、GroESと変性タンパク質を両方結合していることを示している。GroELは、変性タンパク質、GroESと順を追って解離することで確実に基質タンパク質を自らの空洞に閉じ込めていることが、1分子蛍光イメージング法によって明らかになった。1分子計測によって明らかになったシャペロニンの反応サイクルモデルを図3Eに示す<sup>12)</sup>。

### 3. 展 望

#### 3.1 新しい蛍光標識材料

計測技術が急速な進歩を遂げる一方で、有用な蛍光物質が次々に開発されている。従来は、有機蛍光色素分子を用

いてタンパク質を標識していたが、GFPを用いてタンパク質を光らせるという画期的な技術が開発された。GFPは、1960年代にオワンクラゲ (*Aequorea Victoria*) より単離されたタンパク質である。GFPは蛍光を発するための特異な発光素や補因子を必要とせず、GFPのペプチド自身の構造変化によって発色団を形成する。すなわち、GFPが生物の体内でつくられると自然に蛍光を出すようになる。1990年代にGFPの遺伝子配列が明らかになると、たいへんな勢いで細胞生物学の分野で利用されるようになった<sup>14)</sup>。GFPとさまざまなタンパク質との融合タンパク質がつくられ、ついに、緑色に光る大腸菌、線虫、マウスなどの生物が登場した。これにより、遺伝子の発現を生きたままGFPの蛍光によって容易にとらえることができるようになった。現在では、GFPのアミノ酸配列を改変したり、イソギンチャクなど、クラゲ以外の生物の蛍光タンパク質が探索され、より明るく、さまざまな波長の蛍光を発する蛍光タンパク質を得る試みが続けられている。もちろん、1分子のGFPを観察することも可能である。

有機蛍光色素にかわるものとして、量子ドットが注目を集めている。量子ドットは原子が数十～数千個集まった直径数nmの塊であり、ある波長の光を照射すると別の波長の蛍光を放出する。量子ドットに閉じ込められた電子のエネルギー順位は量子ドットのサイズに応じて変化するので、サイズを変えることにより蛍光波長を選択できる。材質がCdSeならば青から赤、InPやInAsならば近赤外から赤外の蛍光を利用できる。CdSeをZnSで被覆した量子ドットはすでに市販されている。Si原子数十個からなる量子ドットも開発されている。これを用いれば、GFPよりも小さな1～3nmの直径で青から赤までの蛍光波長を選択できる。量子ドットは広い吸収スペクトルをもち、一方、蛍光のスペクトル幅は狭い。このため、1色の励起光で多色の量子ドットを同時に励起することが可能である。蛍光の異なる量子ドットの比率を変えてマイクロビーズに埋め込むことにより、数万種類のID化が可能である<sup>15)</sup>。量子ドットは量子効率が30～50%と高く、モル吸光係数も $\sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と大きく、非常に明るい。また、有機色素よりも約100倍光に対して安定である(すなわち退色しにくい)。このため、細胞内で単一の量子ドットを長時間にわたって観察することも可能である。

### 3.2 ナノ開口によるエバネセント場発生

このように、全反射によるエバネセント照明は、ガラス近傍のみを照明するのに有効であるが、二次元的には局所励起を実現できていない。このため、ブラウン運動する蛍光分子が背景光になり、1分子の蛍光分子を見るためには、

溶液中の分子の濃度を50nM以下に抑える必要があった。また、生体分子がガラスに吸着されにくい性質であることが必要条件であった。このように厳しい制約があるので、多分子系の実験を、すべて1分子系の実験に移行できるわけではなかった。しかし、ガラス基板上に金属薄膜を蒸着し直径数十nmの微小開口を配列させた構造が考案され、エバネセント場が縦、横、奥行き方向に三次元的に制御できるようになった。このため、全反射型エバネセント照明の場合よりも照射領域を1000分の1にすることができる。このため、従来の濃度の限界より1000倍も高い濃度(数十 $\mu\text{M}$ )の生体分子を溶液中に漂わせながら、蛍光相関分光法や1分子蛍光イメージング技術を用いて生体分子間相互作用をイメージングすることができるようになった。この技術と、DNA合成酵素が $\gamma$ リン酸を蛍光標識したヌクレオチドを取り込みながらRNAを合成するのを利用して、1分子のDNAの塩基配列を解読することが試みられている<sup>16)</sup>。

量子ドットや微小開口列を用いた1分子蛍光イメージング技術が象徴するように、ナノテクノロジーによる蛍光材料や反応基板の製作が単一分子計測に必要不可欠になりつつある。バイオテクノロジーは、ナノテクノロジーと融合することによって従来の計測限界を打ち破ることだろう。今後の大きな発展が期待される。

## 文 献

- 1) A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka and T. Yanagida: "Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin," *Cell*, **92** (1998) 161-171.
- 2) H. P. Lu, L. Xun and X. S. Xie: "Single-molecule enzymatic dynamics," *Science*, **282** (1998) 1877-1882.
- 3) K. Morikawa and M. Yanagida: "Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method," *J. Biochem. (Tokyo)*, **89** (1981) 693-696.
- 4) T. Yanagida, M. Nakase, K. Nishiyama and F. Oosawa: "Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin," *Nature*, **307** (1984) 58-60.
- 5) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida: "Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution," *Nature*, **374** (1995) 555-559.
- 6) I. Sase, H. Miyata, J. E. Corrie, J. S. Craik and K. Kinoshita, Jr.: "Real time imaging of single fluorophores on moving actin with an epifluorescence microscope," *Biophys. J.*, **69** (1995) 323-328.
- 7) R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada and T. Yanagida: "Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules," *Nature*, **380** (1996) 451-453.

- 8) E. Betzig and R. J. Chichester: "Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy," *Science*, **262** (1993) 1422-1425.
- 9) A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman and P. R. Selvin: "Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization," *Science*, **300** (2003) 2061-2065.
- 10) J. Yamaguchi, N. Nemoto, T. Sasaki, A. Tokumasu, Y. Mimori Kiyosue, T. Yagi and T. Funatsu: "Rapid functional analysis of protein-protein interactions by fluorescent C-terminal labeling and single-molecule imaging," *FEBS Lett.*, **502** (2001) 79-83.
- 11) H. Taguchi, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yoshida and T. Funatsu: "Single-molecule observation of protein-protein interactions in the chaperonin system," *Nat. Biotechnol.*, **19** (2001) 861-865.
- 12) T. Ueno, H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida and T. Funatsu: "GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism," *Mol. Cell*, **14** (2004) 423-434.
- 13) Y. Sako, S. Minoguchi and T. Yanagida: "Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells," *Nat. Cell Biol.*, **2** (2000) 168-172.
- 14) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher: "Green fluorescent protein as a marker for gene expression," *Science*, **263** (1994) 802-805.
- 15) M. Han, X. Gao, J. Z. Su and S. Nie: "Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules," *Nat. Biotechnol.*, **19** (2001) 631-635.
- 16) M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead and W. W. Webb: "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations," *Science*, **299** (2003) 682-686.

(2005年7月4日受理)